

**PRODUCTION OF HYDROLYZED PROTEIN****Publication number:** JP7115969**Publication date:** 1995-05-09**Inventor:** FUJII MIKIO; NAGAOKA YOSHIKO**Applicant:** ASAHI CHEMICAL IND**Classification:**

**- international:** **A23J3/06; A23J3/34; A23L1/227; C12N9/52;**  
**C12R1/38; C12R1/465; A23J3/00; A23L1/226;**  
**C12N9/52; A23L1/226; (IPC1-7): A23J3/06; A23L1/227;**  
**C12N9/52; A23J3/34; C12N9/52; C12R1/38; C12N9/52;**  
**C12R1/465**

**- european:****Application number:** JP19930266467 19931025**Priority number(s):** JP19930266467 19931025**Report a data error here****Abstract of JP7115969**

**PURPOSE:**To obtain an enzymic agent, containing prolyl endopeptidase, prolidase and prolinase derived from the same microorganism and useful for providing a hydrolyzed protein useful as a quality improver, etc., for a seasoning or a food. **CONSTITUTION:**This enzymic agent contains prolyl endopeptidase, prolidase or prolinase derived from the same microorganism (e.g. a bacterium of the genus *Pseudomonas* or *Streptomyces*). Thereby, plural enzymes are stably present and peptide bond in which a hardly hydrolyzable proline residue participates is readily hydrolyzed to improve the hydrolytic ratio of proteins. The treatment with an enzyme having exopeptidase activities is combined therewith to further improve the hydrolytic ratio.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-115969

(43)公開日 平成7年(1995)5月9日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/52		9152-4B		
A 2 3 J 3/34				
// A 2 3 J 3/06				
A 2 3 L 1/227		B		
(C 1 2 N 9/52				

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平5-266467	(71)出願人	000000033 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
(22)出願日	平成5年(1993)10月25日	(72)発明者	藤井 幹夫 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内
		(72)発明者	長岡 由子 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内

(54)【発明の名称】 加水分解蛋白質の製造方法

(57)【要約】

【目的】 呈味力が増強され、味質の良い加水分解蛋白質を製造するための酵素剤ならびに製造法を提供する。

【構成】 同一微生物由来のプロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼを含有することを特徴とする酵素剤および該酵素剤を用いた蛋白質の加水分解法。

【効果】 蛋白質が高度に加水分解され、呈味力が増強される。また、最終産物中のアスパラギン酸、スレオニン、グルタミン酸、プロリン、グリシン等呈味性の高いアミノ酸の遊離率が高まり、味質の良い加水分解蛋白質が製造できる。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 同一微生物由来のプロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼを含有することを特徴とする酵素剤。

【請求項2】 微生物が *Pseudomonas* 属細菌である請求項1記載の酵素剤。

【請求項3】 微生物が *Streptomyces* 属細菌である請求項1記載の酵素剤。

【請求項4】 食品蛋白質、食品蛋白質の部分消化物、および食品蛋白質由来のペプチドを、請求項1乃至請求項3記載の酵素剤で消化することを特徴とする加水分解蛋白質の製造方法。

【請求項5】 エキソペプチダーゼ活性を有する酵素による消化を組み合わせることを特徴とする請求項4記載の加水分解蛋白質の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、加水分解蛋白質の製造方法に関する。加水分解蛋白質は調味料、食品の品質改良剤等に幅広く利用されている。

【0002】

【従来の技術】 蛋白質の加水分解は従来鉱酸を添加して高温、高圧処理する事により行われている。特に食品用途では、製品に苦味を生じさせないために塩酸が用いられている。しかしながら、蛋白質を塩酸で加水分解した場合には蛋白質中に微量に残存している油脂類と塩酸とが反応する事によりモノクロロプロパンジオール (MCP) やジクロロプロパノール (DCP) 等の好ましくない塩素化化合物が生成することが近年問題になりつつある。一方、蛋白質分解酵素を用いた蛋白質の加水分解も多く報告されているが、高価な酵素を多量に必要とすること、反応中に雑菌汚染を生じる可能性が高いこと、さらに蛋白質を高度に加水分解することが困難であることから、実用化されている例は少ない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の課題は、複数の酵素が安定に存在しうる酵素剤を提供することにより、該酵素剤を用いて蛋白質を高度に加水分解する方法を開発することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】 酵素による加水分解で蛋白質の加水分解率が低い原因としては、蛋白質中に存在するプロリン残基がポイントと考えられる。すなわち、プロリンは環状 $\alpha$ -イミノ酸であり、他のアミノ酸とは異なる立体構造をしている。蛋白質またはペプチド中のプロリン残基のイミノ基やカルボキシル基が関与するペプチド結合は通常の蛋白質分解酵素による加水分解を受けにくいことが理由として考えられる。本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意検討した結果、同一微生物由来のプロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよび

2

プロリナーゼを含有する酵素剤による処理、あるいは当該酵素剤処理とエキソペプチダーゼ活性を有する酵素による処理とを組み合わせることにより、従来加水分解され難かったプロリン残基が関与するペプチド結合が効率よく加水分解され、その結果、蛋白質の加水分解率を高めることができることを発見し、本発明を完成させるに至った。プロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼは、ほ乳類の臓器に広く分布しているが、臓器の入手が困難であるため、入手容易な微生物由来の酵素剤を用いることが望ましい。また、上記3種の酵素を別々の微生物から調製し、これらを混合することにより本発明と同様の操作を行うことも可能ではあるが、由来の異なる蛋白分解系酵素を混合した場合には、それぞれの酵素が互いに別の酵素蛋白質を加水分解する結果、酵素活性が急激に低下する恐れがある。これに対し、同一微生物由来の酵素の場合には、長期間の培養後でも安定に存在していたものであり、これらを同時に存在させても上記のような活性低下の恐れはない。

【0005】 プロリルエンドペプチダーゼ (別名ポストプロリンクリーピング酵素またはプロリン特異的エンドペプチダーゼ、EC 3.4.21.26) を生産する微生物としては、*Flavobacterium* 属細菌、*Xanthomonas* 属細菌、*Alcaligenes* 属細菌、*Streptomyces* 属の放線菌が報告されている。通常のプロリルエンドペプチダーゼは低分子ペプチドには作用するものの高分子ペプチドや蛋白質には作用しないが、*Streptomyces xanthophaeus* HA-36株が生産するプロリルエンドペプチダーゼはカゼイン等の高分子基質を加水分解することが報告されている。これら微生物以外にもプロリルエンドペプチダーゼを生産する微生物を新たにスクリーニングすることにより新規プロリルエンドペプチダーゼを取得することも可能である。プロリルエンドペプチダーゼを生産する微生物は、その培養液をカルボベンゾキシーアラニル-アラニル-プロリル-パラニトロアニリド (以下Z-Ala-Ala-Pro-pNAと略す) に作用させ、黄色のパラニトロアニリンを遊離させることを指標に土壌等より分離することができる。

【0006】 プロリダーゼ (別名プロリンジペプチダーゼ、EC 3.4.13.9) を生産する微生物としては、*Escherichia coli*、*Lactococcus lactis*、*Streptococcus cremoris*、*Neurospora* 属糸状菌、*Thermus aquaticus*、*Pseudomonas* 属細菌等が報告されている。プロリダーゼはX-Proの構造のジペプチドを加水分解するが、X-Pro-Yの構造のトリペプチドのX-Pro結合を加水分解する場合もある。これら微生物以外にもプロリダーゼを生産する微生物を新たにスクリーニングするこ

とにより新規プロリダーゼを取得することも可能である。プロリダーゼを生産する微生物は、その培養液をグリシールプロリン（以下Gly-Proと略す）に作用させた後に生じる遊離プロリンを指標に土壤等より分離することができる。

【0007】プロリナーゼ（別名プロリルジペプチダーゼ、EC 3. 4. 13. 8）を生産する微生物としては、*Streptococcus cremoris*、*Streptococcus thermophilus* 等が報告されている。プロリナーゼはPro-Xの構造のジペプチドを加水分解する酵素であり、これら微生物以外にもプロリナーゼを生産する微生物を新たにスクリーニングすることにより新規プロリナーゼを取得することも可能である。プロリナーゼを生産する微生物は、その培養液をプロリルグリシン（以下Pro-Glyと略す）に作用させた後に生じる遊離プロリンを指標に土壤等より分離することができる。

【0008】プロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼを同時に生産する微生物として、*Pseudomonas* sp. KU-22株および*Streptomyces xanthophaeus* HA-36株があげられる。*Pseudomonas* sp. KU-22株は好気性の桿菌であり、YM培地（ポリペプトン0. 5%、酵母エキス0. 3%、マルトエキス0. 3%、グルコース1. 0%、寒天1. 0%、pH7. 2）上30℃で培養した場合に淡黄土色、湿潤で光沢のあるコロニーを形成する。細胞のサイズは0. 4μm×1. 6μmの直桿菌であり、グラム染色陰性、運動性あり、極性鞭毛、ウレアーゼテスト陽性、カタラーゼテスト陽性、オキシダーゼテスト陽性、クエン酸利用テスト陽性、澱粉加水分解テスト陰性、グルコース酸化能（OF-テスト）陽性、キノンはQ-9、黄色色素産生なし、水溶性色素産生なし、蛍光色素産生なし、アルギニン加水分解酵素テスト陰性、フォーグスプロスカウエルテスト（VPテスト）陰性、硝酸還元テスト陰性、メチルレッドテスト陰性、D-グルコース、D-マニトール、D-マンノース、エタノール、スクロースより好気条件下に酸を生成しない、37℃、40℃、42℃で生育し、45℃で生育しない、5%食塩存在下に生育し、10%食塩存在下に生育しない、好気条件下にD-グルコース、D-マニトール、D-マンノース、酢酸を資化し、スクロースを資化しない。尚、本菌株は工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-13788として寄託されている。

【0009】*Pseudomonas* sp. KU-22の培養液より酵素剤を得る方法は公知の方法をそのまま、または一部修正して用いることができる。これらペプチダーゼの生産に適する培地としては、グルコース、脱脂大豆、食塩を含有する培地が有効である。培養温度30℃で2日間程度の培養により著量のプロリルエンド

ペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼが培地中に生産される。酵素の収量を増大させるために、超音波による菌体破碎または浸透圧ショック等を行うことも有効である。菌体または菌体残渣を除去した後、たとえば硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等を行うことによりそれぞれの酵素が精製できるが、蛋白質の加水分解を行う場合には培養液や菌体破碎液をそのまま、または粗精製程度で充分である。

10 【0010】*Streptomyces xanthophaeus* HA-36株はスターチ・無機塩寒天培地で30℃で培養することにより、よく分岐した基菌糸からstraight~flexurusの気菌糸を伸長し、成熟した気菌糸の先に10~50個の楕円~円筒形の孢子からなる孢子鎖を形成する。孢子嚢は無く、孢子の大きさは0. 7~1. 0×1. 0~1. 5μmで、孢子表面はsmoothであり、鞭毛は認められない。本菌株の細胞壁の糖成分には特に特徴は認められず、細胞壁成分のジアミノピメリン酸はLL型である。尚、本菌株は工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-13827として寄託されている。

【0011】*Streptomyces xanthophaeus* HA-36株の培養液より酵素剤を得る方法は、公知の方法をそのまま、または一部修正して用いることができる。ペプチダーゼの生産に適する培地としては、グルコース、澱粉、乾燥酵母、食塩を含有する培地が有効である。培養温度30℃で4日間程度培養することにより著量のプロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼが培地中に生産される。菌体および不溶性成分を除去した後、たとえば硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等を行うことによりそれぞれの酵素が精製できるが、蛋白質の加水分解を行う場合には培養液をそのまま、または粗精製程度で充分である。尚、既知のプロリルエンドペプチダーゼは通常高分子の基質に対しては全く作用しないが、本微生物が生産するプロリルエンドペプチダーゼは高分子基質であるカゼインに対しても加水分解活性を示すことが特徴である。

40 【0012】蛋白質を加水分解する場合には、まず対象となる蛋白質を通常の蛋白質加水分解酵素で低分子化しておくことが望ましい。用いる酵素としてはエンド型活性の高いものが適している。市販の酵素としてはノボ社のアルカラゼやニュートラーゼ、天野製薬のプロテアーゼN等が利用できる。エンド型酵素による消化が終了した後に残存する酵素はプロリルエンドペプチダーゼの安定性に悪影響を及ぼす場合があるため、限外濾過等による除去または加熱失活等を行っておくことが望ましい。

50 【0013】あらかじめエンド型酵素で処理した蛋白質

をプロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼを含む酵素剤で処理する場合には、同一微生物の培養物や細胞破砕液をそのまま使用するか、またはこれらより酵素を粗精製したものを用いることができる。反応は通常の酵素反応と同じく酵素が失活しない程度の一定の温度で攪拌条件で行うことが望ましい。

【0014】加水分解の最終段階として、エキソ型活性の高い酵素による加水分解を行ってもよい。エキソ型酵素による加水分解に先立ち、プロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼの除去または失活処理を行うことは必ずしも必要ではない。反応液のpHを適宜調整した後、エキソ型活性の高い酵素を添加して反応を行う。用いる酵素としては天野製薬のプロテアーゼM、プロテアーゼA、科研製薬のアクチナーゼ等の酵素が利用可能であるが、*Aspergillus*属、*Rhizopus*属、*Streptomyces*属等の培養液等を酵素剤の代わりに用いることも可能である。酵素反応が終了した後、脱色、濃縮、殺菌等の処理を行い、目的の加水分解蛋白質が調製される。

【0015】本発明により得られる加水分解蛋白質は、プロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼを含む酵素剤による加水分解工程を行わない場合に比較してその加水分解率（アミノ酸の遊離率）が上昇しており、中でもグルタミン酸、グリシン、プロリン等の呈味性の高いアミノ酸の遊離率が特に上昇するため、食品用途、特に調味料としての利用価値がより高まることが特徴である。

【0016】以下に本発明の実施例を示すが、本発明がこれらに限定されるものではない。

【0017】

【実施例】

【0018】

【実施例1】

1) KU-22粗酵素液の調製

*Pseudomonas* sp. KU-22株を2%グルコース、2%脱脂大豆、0.3%食塩よりなる培地100ml (pH7.2)を含む500ml容坂口フラスコ6本に移植し、30℃で48時間振盪培養を行った。培養液より遠心分離により(8,000×g、20分)菌体を集め、20mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)で2回洗浄後、菌体を超音波処理することにより粉砕した。その後遠心分離(8,000×g、20分)により細胞残渣を除去することにより無細胞抽出液233mlを得た。この無細胞抽出液を水中で冷却攪拌しながら90%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、30分間水中で攪拌させた後4℃で一晩放置した。沈殿物をセライト濾過により回収し、氷冷した20mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0) (以下緩衝液Aと称する)に溶解し、遠心分離(8,000×g、20分)によりセライトを除去した。続いて緩衝液Aに対して透析を行

い、粗酵素液を得た(以下KU-22粗酵素液と称する)。

【0019】プロリルエンドペプチダーゼ活性の測定は以下の条件にて行った。即ち、1mM Z-Ala-Ala-Pro-pNA (40%メタノールに溶解) 200μlに50mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0) 800μlを加え、37℃で5分間予備保温した後、酵素サンプル(緩衝液Aで適宜希釈したもの) 200μlを添加して30分間反応させた。1Mの酢酸ナトリウム緩衝液(pH3.5)を400μl加えて反応を停止させた。基質に1M酢酸緩衝液(pH3.5)をあらかじめ加えた後で酵素サンプルを添加したものをブランクとして410nmの吸光を測定し、反応により遊離したパラニトリアニリンの量を求めた。尚、プロリルエンドペプチダーゼ1単位は1分間に1μmolのパラニトリアニリン相当量を遊離させるのに必要な酵素量と定義した。KU-22粗酵素液のプロリルエンドペプチダーゼの活性は0.14単位/mlであった。

【0020】プロリダーゼ活性の測定は以下の条件で行った。即ち、5mM Gly-Proを含む緩衝液Aに酵素サンプル(緩衝液Aで適宜希釈したもの) 10μlを加え、37℃で30分間反応させた。これに和光純薬製ニンヒドリン液(アミノ酸自動分析装置用) 40μlを加え、70℃で20分間加熱した後、蒸留水で10倍に希釈した。同時に、Gly-Pro溶液にニンヒドリン液を添加し、引き続き酵素サンプルを添加してニンヒドリン反応させ、蒸留水で10倍に希釈したものをブランクとした。それぞれの350nmの吸光度を測定することにより、酵素反応により生じた350nmの吸光度の増加を求めた。一方、5mMのGly-Pro溶液と、5mMグリシンおよび5mMプロリンを含む溶液を適宜混合し、この混合液200μlに蒸留水10μlを加え、上記と同様にニンヒドリン反応と蒸留水による希釈を行ったものを各種準備し、これらの350nmの吸光度を測定して標準曲線を作成した。標準曲線より遊離プロリンの濃度を求め、プロリダーゼにより生じたプロリン量を算出した。尚、プロリダーゼ1単位は1分間に1μmolのプロリンを遊離させるのに必要な酵素量と定義した。KU-22粗酵素液のプロリダーゼ活性は0.64単位/mlであった。

【0021】プロリナーゼ活性の測定は以下の条件で行った。即ち、5mM Pro-Glyを含む緩衝液Aに酵素サンプル(緩衝液Aで適宜希釈したもの) 10μlを加え、37℃で30分間反応させた。これに和光純薬製ニンヒドリン液(アミノ酸自動分析装置用) 40μlを加え、70℃で20分間加熱した後、蒸留水で10倍に希釈した。同時に、Pro-Gly溶液にニンヒドリン液を添加し、引き続き酵素サンプルを添加してニンヒドリン反応させ、蒸留水で10倍に希釈したものをブランクとした。それぞれの350nmの吸光度を測定する

ことにより、酵素反応により生じた350nmの吸光度の増加を求めた。一方、5mMのPro-Gly溶液と、5mMグリシンおよび5mMプロリンを含む溶液を適宜混合し、この混合液200μlに蒸留水10μlを加え、上記と同様にニンヒドリン反応と蒸留水による希釈を行ったものを各種準備し、これらの350nmの吸光度を測定して標準曲線を作成した。標準曲線より遊離プロリンの濃度を求め、プロリダーゼにより生じたプロリン量を算出した。尚、プロリナーゼ1単位は1分間に1μmolのプロリンを遊離させるのに必要な酵素量と定義した。KU-22粗酵素液のプロリナーゼ活性は1.3単位/mlであった。

## 2) HA-36粗酵素液の調製

*Streptomyces xanthophaeus*

HA-36株を1%グルコース、1%可溶性澱粉、2%乾燥酵母、0.3%食塩よりなる培地100ml (pH7.2)を含む500ml容瓶口フラスコ20本に移植し、30℃で4日間振盪培養を行った。培養液を遠心分離(8,000×g、20分)することにより菌体を除き、この液を水中で冷却攪拌しながら80%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、30分間水中で攪拌させた後4℃で一晩放置した。沈澱物を遠心分離(8,000×g、20分)により回収し、氷冷した緩衝液Aに溶解させた。続いて緩衝液Aに対して透析を行い、粗酵素液を得た(以下HA-36粗酵素液と称する)。プロリルエンドペプチダーゼ活性は0.073単位/ml、プロリダーゼ活性は0.039単位/ml、プロリナーゼ活性は0.070単位/mlであった。

## 3) 蛋白質の調製とアルカラゼ処理

5リットル容高圧オートクレーブに豚骨3600gと水720gを仕込み、密封後に昇温を開始した。オートクレーブの内圧が0.5kg/cm<sup>2</sup>に達したらオートク

\*レーブ内のエア抜きを実施し、再度密封してオートクレーブの内圧が5kg/cm<sup>2</sup>になるまで加熱し、1時間煮出しを行った。冷却後、オートクレーブ内の液を5リットル容分液ロートに移し、上層の油を除いて下層の豚骨抽出液2400gを回収し、これをエバポレーターで濃縮してT-N7.7%、F-N0.39%の濃縮液450gを得た。本濃縮液210gに水を780gを加えて希釈後、16%水酸化ナトリウム溶液を加えてpHを8.0に調整した。この溶液にアルカラゼ0.6L(ノボ社製)を4g添加し、55℃で6時間反応させた。反応中のpHは16%水酸化ナトリウム溶液で常時8.0となるように調整した。反応終了液を分画分子量6000の限外濾過膜(旭化成社製SIP-1013)で濾過して酵素を除去した。本アルカラゼ処理液はT-N=1.63%、F-N=0.204%であり、加水分解率は12.5%と算出された。

## 4) 粗酵素液およびプロテアーゼMによる加水分解

3本の試験管A、B、Cに上記3)で得られたアルカラゼ処理液をそれぞれ15mlずつ分注した。試験管Aには上記1)で得られたKU-22粗酵素液1.5mlを、試験管Bには上記2)で得られたHA-36粗酵素液1.5mlを、また試験管Cには蒸留水1.5mlを添加して37℃で24時間反応させた。反応終了後、pHをそれぞれ5.0に調整し、天野製薬製プロテアーゼMをそれぞれ0.2gずつ添加し、50℃で24時間反応させた。反応終了液をそれぞれサンプルA、B、Cと称し、ケルダール窒素(T-N)およびホルモール窒素(F-N)の分析を行った。表1に結果を示した通り、サンプルAおよびBではコントロールであるサンプルCに比べて加水分解率が約10%高くなっていた。

【0022】

【表1】

プロリルエンドペプチダーゼによる蛋白質の加水分解

サンプル	T-N (%)	F-N (%)	分解率 (%)
A	1.50	0.463	30.9
B	1.48	0.436	29.5
C	1.51	0.343	22.7

【0023】

【実施例2】

## 1) KU-22粗酵素液の調製

*Pseudomonas* sp. KU-22株を2%グルコース、2%脱脂大豆、0.3%食塩よりなる培地500ml (pH7.2)を含む5リットル容フラスコ20本に移植し、30℃で48時間振盪培養を行った。培養

液より遠心分離により(8,000×g、20分)菌体を集め、50mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)で3回洗浄後、50mM トリス-塩酸+1mM EDTA (pH8.0)+0.5M スクロースの緩衝液中に懸濁した。30℃で30分間保温した後菌体を集め(8,000×g、20分)、これに50mM トリス-塩酸+1mM EDTAの緩衝液を加えて懸濁し、3

0℃で30分間保温することにより浸透圧ショックを施した。遠心分離(10,000×g、20分)により菌体を除去し、上澄液を旭化成社製限外濾過モジュールAIP-0013で濾過することにより酵素を濃縮し、1mMの塩化マンガンを含む緩衝液Aに対して透析を行った結果、プロリルエンドペプチダーゼ活性が0.38単位/ml、プロリダーゼ活性が1.7単位/ml、プロリナーゼ活性が3.2単位/mlの酵素液約40mlを得た。

## 2) 蛋白質の調製とアルカラーゼ処理

前記実施例3の3)と同様の方法を用いて豚骨からの蛋白質の調製とアルカラーゼ処理を行い、T-N=1.6%、F-N=0.14%のアルカラーゼ処理液を得た。

## 3) 粗酵素液およびプロテアーゼMによる加水分解

500ml容三角フラスコに上記2)で得られたアルカ\*

プロリルエンドペプチダーゼによる蛋白質の加水分解

サンプル	T-N (%)	F-N (%)	分解率 (%)
D	1.40	0.56	40
E	1.41	0.40	28

【0025】サンプルDおよびEにつき、アミノ酸分析を行った。全アミノ酸を測定する場合にはサンプルを6Nの塩酸存在下、120℃で18時間加水分解した後、遊離アミノ酸を測定する場合にはそのまま、日本電子社製JLC-300アミノ酸分析装置にて分析した。その結果を表7に示したが、サンプルDはサンプルEに比べ

\*ラーゼ処理液200mlと上記1)で得られた粗酵素液30mlを加え、マグネチックスターラーで攪拌しながら37℃で24時間反応させた。反応終了後、塩酸を加えてpHを5.0に調整し、旭化成社製限外濾過モジュールAIP-0013で濾過することにより酵素を除去した。この液に天野製薬のプロテアーゼMを5g添加し、スターラーで攪拌しながら50℃で30時間反応させた(サンプルD)。一方、粗酵素液の代わりに蒸留水を添加する以外全く同様に処理したものをコントロールサンプル(サンプルE)とした。サンプルD、EにつきT-NとF-Nの測定を行った結果(表2)サンプルEの分解率が26%であったのに対しサンプルDでは40%と高くなっていた。

【0024】

【表2】

てアスパラギン酸、スレオニン、グルタミン酸、プロリン、グリシン等の呈味性アミノ酸の遊離率が大幅に高まっており、苦みを呈する疎水性アミノ酸の遊離率はあまり増加していないことが確認された。

【0026】

【表3】

## 遊離アミノ酸の変化

アミノ酸	サンプルD	サンプルE
Asp	1.54	0.70
Ser	3.03	1.20
Thr	2.15	1.13
Glu	2.56	1.35
Pro	3.07	1.53
Gly	6.11	2.19
Ala	6.75	4.46
Cys	0.37	0.33
Val	2.88	1.94
Met	0.72	0.83
Ile	1.60	1.06
Leu	3.27	2.45
Tyr	1.83	0.94
Phe	1.54	1.09
His	1.09	1.12
Lys	1.66	1.02
Arg	2.20	1.81

サンプル中の全アミノ酸のモル数の合計に対する各遊離アミノ酸のモル数の比(%)で表示。

## 【0027】

【発明の効果】蛋白質の加水分解にプロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼを含む酵素剤による処理とエキソペプチダーゼによる処理とを組み

合わせるにより加水分解率が向上し、さらに呈味性に優れたアミノ酸の遊離率が向上することから、食品、特に調味料用途の蛋白質の加水分解に効果的に利用できる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

C12R 1:38)

(C12N 9/52

C12R 1:465)

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所